



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

**Pasantía de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Microbiología**

Aislamiento y caracterización de bacterias nativas del género *Bacillus*

Tesista: Nicolás Giannone Espósito

Tutor: Dra. M.Sc. María Teresa Federici

Co-tutor: Lic. Bqco. Federico Rivas Franco (M.Sc.)

Unidad de Biotecnología

y

Laboratorio de Bioproducción

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, Las Brujas

Mayo de 2015

Agradecimientos

A María Teresa por guiarme en este proceso, por el constante aprendizaje, dedicación, paciencia y apoyo en todo momento.

A Federico Rivas por su cooperación, sus críticas constructivas, su ayuda y dedicación desde la distancia.

A Bea, que me enseñó todo para manejarme en el laboratorio, excelente compañera de trabajo haciendo que las largas jornadas de trabajo sean rendidoras y llevaderas.

A Daniel R. Zeigler director de "*Bacillus Genetic Stock Center*" por enviar las cepas de referencia.

A las compañeras de laboratorio, Elena, Lourdes, Ceci, Nati, Mariana, Pati y Claudia.

A Belén que siempre me hacía un lugar en el autoclave, divina total!

A mis compañeros y amigos que llevamos esta carrera juntos pero a destiempo, la banda del sucucho tuvo sus frutos!

A mis padres por bancarme hasta el final, a mi abuelo, que en paz descanse, fue el motor para terminar mi carrera; por eso te lo dedico a ti abuelito. A mi abuela que siempre estuvo firme en todo! Siempre apoyando y rezando para que salga todo bien. Una genia!

Y a mí bis abuela, que en paz descanse, siempre llamaba para ver cómo me estaba yendo con la carrera. Una alegría bárbara escuchar su risa de alegría cuando salvaba algún examen.

Gracias a todos por confiar y bancarme hasta el final.

Contenido

Introducción	6
1. Control Biológico.....	7
1.1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.2. Características generales del género <i>Bacillus</i>	8
1.3. Espectro de actividad insecticida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	9
1.5. Estructura de las proteínas Cry.....	11
1.6. Nomenclatura de las proteínas Cry.	11
1.7. Identificación de genes cry.	12
2. Ortópteros en el Uruguay.	12
2.1. Biología y ecología de las tucuras.....	13
2.2. Daños y estrategias de control.	13
2.3. Situación en Uruguay.	14
2.4. Marco de trabajo.....	14
Objetivos de trabajo	15
3. Objetivos específicos.	15
Materiales y Métodos	16
4. Obtención de muestras y procesamiento.....	16
4.1. Muestras de suelo, rizósfera y tucuras.....	16
4.2. Procesamiento de las muestras para la obtención de Bt.....	16
4.3. Caracterización morfológica y bioquímica.	18
4.3.1. Descripción de la colonia.	18
4.3.2. Movilidad y morfología celular.	18
4.3.3. Clasificación de Gram.....	18
4.3.4. Prueba de la actividad catalasa.	19
4.4. Caracterización molecular	19
4.4.1. Extracción de ADN.....	20
4.4.2. Determinación de la concentración y calidad del ADN.....	20
4.4.3. Amplificación de variantes del gen cry1 y cry7 por PRC.	20
4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	21
Resultados	22
5. Aislamientos bacterianos obtenidos.....	22
5.1. Clasificación de Gram.....	22

5.2. Caracterización morfológica y bioquímica	22
5.3. Movilidad y actividad de la catalasa	23
5.4. Amplificación de genes <i>cry1</i> y <i>cry7</i>	23
Discusión.....	25
Conclusiones	28
Perspectivas.....	29
Bibliografía	30

Resumen

El uso de pesticidas para el control de plagas genera preocupación por su impacto no solo en el ambiente sino también en la salud de los consumidores de productos agrícolas. Este hecho ha llevado a la búsqueda y utilización de métodos de control alternativos, eficientes y seguros, tanto desde el punto de vista ambiental como de la salud humana y animal. Uno de estos métodos alternativos es la estrategia conocida como control biológico que consiste en la utilización de microorganismos patógenos para el control de las plagas agrícolas. Entre los agentes de control biológico bacterianos, *Bacillus thuringiensis* es el más estudiado para este fin debido a que produce cristales proteicos con actividad insecticida durante la fase de esporulación. Si bien en otros países se han desarrollado biopesticidas basados en aislamientos de *B. thuringiensis*, en Uruguay no se cuenta con ningún producto registrado basado en cepas locales de esta especie. Por estas razones se propuso obtener y caracterizar aislamientos nativos de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo, rizósfera de maíz e insectos ortópteros (tucuras) para su desarrollo como agente de control biológico. Las muestras de suelo y rizósfera de maíz fueron tomadas de un ensayo experimental instalado en la Estación Experimental “Wilson Ferreira Aldunate” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - Las Brujas. Además, se utilizaron tucuras capturadas en los departamentos de Florida y Durazno donde se ha observado un aumento en su población a causa de las sequías registradas en los años 1999, 2000, 2004 y 2008. En total se procesaron dos muestras de suelo, 12 de rizósfera y 12 de tucuras, de las cuales se obtuvieron un total de 100 aislamientos bacterianos. Estos aislamientos fueron comparados con cepas de referencia obtenidas del “*Bacillus Genetic Stock Center*”. La caracterización bioquímica (ensayo de la catalasa y clasificación de Gram por la técnica de KOH), la morfología de la colonia y la movilidad de la bacteria permitieron seleccionar 16 aislamientos para estudios moleculares con el fin de determinar la presencia de genes *cry* por PCR con cebadores universales para el grupo de genes *cry1* y *cry7*. Los resultados mostraron que cinco de estos aislamientos presentaban genes *cry1*. Estos genes son los más comunes en *B. thuringiensis* con actividad insecticida contra insectos del orden de Lepidóptera. Esta información junto a los datos obtenidos a partir de la secuenciación del fragmento 16S, permitió identificar que cuatro de ellos pertenecen al género *Bacillus* (un aislamiento a *B. thuringiensis*, otro a *B. amyloliquefaciens* y dos a *B. aryabhatai*) siendo candidatos para su posible utilización en el control biológico de plagas agrícolas.

Introducción

El aumento de la población mundial está acompañado de una mayor demanda de productos del sector agrícola (Apaydin, 2004). Sin embargo, la tierra útil para la producción es limitada y además su uso está condicionado principalmente por la disponibilidad de agua y otros recursos, por lo que resulta importante optimizar el rendimiento de la producción (Apaydin, 2004; Oerke y Dehne, 2004). En el Uruguay, el sector agrícola ha mostrado un crecimiento exponencial en los últimos 10 años, por ejemplo el cultivo de soja aumentó de 15.000 hectáreas en 2002 a 1.050.000 hectáreas en 2012 (MGAP-DIEA, 2013). Este cultivo, al igual que el maíz, el sorgo, el tomate y el morrón entre otros, son particularmente sensibles al ataque por insectos (Apaydin, 2004; Boulter et al., 1989). Estos invertebrados son el grupo de animales más abundantes en la tierra y afectan a las plantas de forma directa, alimentándose de ellas, como las hormigas y tucuras o de forma indirecta por la transmisión de hongos, virus y bacterias. Por ejemplo, *Xylella fastidiosa* es una bacteria que afecta principalmente cultivos leñosos como los cítricos y la vid; se transmite de forma natural de unas plantas a otras con la ayuda de insectos vectores que se alimentan del xilema (Janse y Obradovic, 2010). La mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*) es un ejemplo que afecta de forma directa e indirecta a la planta. Directamente porque debilita a la planta al alimentarse sobre las hojas por succión de savia. Indirectamente porque este compuesto rico en azúcares (excretado por el insecto) sirve de soporte para el desarrollo del hongo *Negrilla* o *Mangla* (Fumagina) y además la mosca blanca es vector del virus de la cuchara (Apaydin, 2004; Glazer y Nikaido, 1994; Janse y Obradovic, 2010; Song et al., 2008). Por estas razones, el hombre debe controlar las poblaciones de los insectos plaga para obtener un mejor rendimiento en los cultivos y evitar los daños ocasionados por la transmisión de hongos, virus y bacterias. En 1800, en paralelo con el desarrollo de la química, se desarrollaron los primeros compuestos químicos, productos inorgánicos y orgánicos de arsénico. Posteriormente, le siguieron compuestos organoclorados, organofosforados, piretroides, carbamatos y formamidinas (Apaydin, 2004; Glazer y Nikaido, 1994). A pesar de ser eficaces para el control de plagas, presentan efectos adversos, directos e indirectos sobre los ecosistemas como por ejemplo la acumulación de residuos tóxicos en la naturaleza provocando problemas de salud en los mamíferos. El uso desmedido de estos compuestos químicos ha dado lugar al desarrollo de resistencia en los insectos plaga (Apaydin, 2004; Berón, 2005; Glazer y Nikaido, 1994). Como consecuencia de estos problemas junto a la presión que imponen los consumidores por alimentos sanos, el hombre se ha orientado a encontrar formas seguras y naturales para el control de los insectos plagas (Glazer y Nikaido, 1994).

1. Control Biológico.

El control biológico consiste en la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales; es decir mediante la acción de predadores, parásitos y patógenos (virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos) que causan la muerte o enfermedades entre las plagas. En definitiva, lo que se busca es reducir la población de la plaga a un nivel en el cual no cause un daño económico. Este tipo de control tiene menor impacto ecológico que el uso de compuestos químicos (Estrada, N. C. I., 2008; Hernández et al., 1997).

En la naturaleza existen microorganismos con la capacidad de producir toxinas que afectan a los insectos y se denominan entomopatógenos. Algunos de estos poseen un limitado rango de hospederos por lo que no presentan virulencia hacia otros insectos e incluso vertebrados (Glazer y Nikaido, 1994; Pardo-López et al., 2009; Sauka y Benintende, 2008; Wu et al., 2011). En este sentido, el uso de microorganismos entomopatógenos específicos surge como una alternativa natural para el control de insectos plagas. Por ejemplo, bioinsecticidas a base de virus de insectos (baculovirus), hongos, protozoarios y bacterias se comercializan con éxito a nivel mundial. Entre estos microorganismos, *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el más importante ya que presenta actividad entomopatógena contra varios ordenes de insectos (Apaydin, 2004; Ben-Dov et al., 1997; Carmona, 2002; Escudero et al., 2004; Höfte y Whiteley, 1989; Sauka y Benintende, 2008).

Hasta el momento se han registrado más de 400 formulaciones a base de Bt, siendo las marcas más utilizadas Dipel® y Thuricide® (producidos en Argentina y Estados Unidos respectivamente). En Uruguay actualmente no se cuenta con productos a base de Bt y sería una gran innovación la producción de un bioinsecticida nacional (MGAP, 2014).

Recientemente, (2013), la Dirección General de Servicios Agrícolas del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca autorizó la venta de Lecafol® (Lage & Cia.), en el primer bioplaguicida de producción nacional que se comercializa en el mercado. Este producto, de uso en invernáculo para cultivos de tomate, está formulado a base del hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* que posee actividad bioinsecticida contra la mosca blanca (revista INIA N°30).

1.1. Historia de *Bacillus thuringiensis*.

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1901 por el científico japonés Shigetane Ishiwata a partir del gusano de *Bombyx mori* (lepidóptero) con síntomas de la enfermedad conocida como *sotto* por lo que la llamó *Bacillus sotto*. En 1911, Berliner describe formalmente a la especie a partir de una larva enferma de la polilla de la harina (*Anagasta kuehniella*) que mostraba la enfermedad del Mediterráneo. Encontrada en el pueblo alemán llamado Thuringia del cual finalmente toma su nombre (Apaydin, 2004). Posteriormente en Francia, en 1938, se desarrolló

un producto comercial contra la polilla de la harina llamado Sporeine (Apaydin, 2004; Roh et al., 2007). En 1956 se determinó que la actividad contra lepidópteros se debía a los cuerpos parasporales encontrados junto a las esporas (Figura 1). Esto incrementó los estudios en su estructura, bioquímica y mecanismo de acción de la toxina. En 1950 se empezó a usar comercialmente en Estados Unidos y fue registrado en 1961 como biopesticida por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés). Posteriormente se fueron descubriendo nuevas cepas con actividad insecticida contra dípteros (1976) y coleópteros (1983) (Apaydin, 2004; Asokan, 2008; Krieg et al., 1983; Glazer y Nikaido, 1994; Wu et al., 2011). Para finales de los años 80 se desarrollaron las primeras plantas de tabaco y tomate transgénicas conteniendo genes *cry* (Apaydin, 2004; Van Frankenhuyzen, 1993), pero fue la planta de algodón la primera en ser registrada por EPA (USEPA, 1999) como transgénica. A partir de 1990, con el rápido desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, esta técnica pasó a ser una herramienta importante para el desarrollo de cultivos Bt genéticamente manipulados. Los principales cultivos transgénicos Bt son de maíz, algodón, soja, papa y arroz. Estos se comercializan actualmente en Canadá, Japón, México, Brasil, Uruguay, Argentina, Australia y Estados Unidos entre otros (Apaydin, 2004, Frutos et al., 1999, Roh et al., 2007). En el Uruguay hay cuatro eventos autorizados de soja y 10 eventos de maíz (Galeano, 2013; MGAP, 2015).

1.2. Características generales del género *Bacillus*.

Las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son: forma de bastón, movilidad por flagelos peritricos, capacidad de formar endosporas, son aerobias estrictas o facultativas, Gram positivas y catalasa positivas. Entre las especies más representativas del género *Bacillus* se encuentran *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa* y *B. thuringiensis* entre otros. De todos ellos, *B. thuringiensis* es el más estudiado para el control biológico de plagas. Fue aislado de suelos, insectos muertos, agua y polvo entre otros (Ammounh et al., 2011; Asokan, 2008; Ben-Dov et al., 1997; Carmona, 2002; Glazer y Nikaido, 1994; Martin y Travers, 1989; Lui et al., 2012; Sauka y Benintende, 2008). Durante el proceso de esporulación, produce grandes proteínas cristalinas que son tóxicas para muchos insectos plagas (Figura 1). Estas proteínas son codificadas por los llamados genes *cry* que en general se encuentran en plásmidos de alto y bajo peso molecular y pueden ser transmitidos por conjugación a otras bacterias relacionadas como *Bacillus cereus* (Apaydin, 2004; Hu et al., 2004). Estos genes se han encontrado también insertos en el cromosoma de la bacteria (Apaydin, 2004; Sauka y Benintende, 2008).

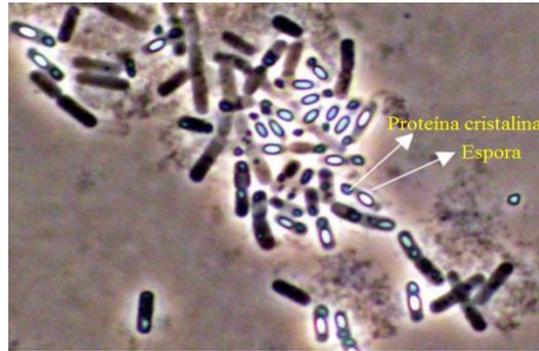


Figura 1. Células de *Bacillus thuringiensis*. Se aprecia una proteína cristalina junto a una espora. Tomada de Apaydin, 2004

1.3. Espectro de actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis*.

El espectro de actividad insecticida hacia las larvas de insectos dentro de las cepas de *B. thuringiensis* comprende principalmente tres órdenes: Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. Sin embargo, se han encontrado nuevas bacterias con propiedades insecticidas poco comunes, por ejemplo, hacia nemátodos, ácaros y adultos de mosca doméstica (Apaydin, 2004; Carmona, 2002; Feitelson, 1993). Las proteínas tóxicas para lepidópteros pertenecen a los grupos Cry1 y Cry9. En coleópteros son los grupos Cry3, Cry7 y Cry8; mientras que en dípteros son Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17 y Cry19. Por su parte, el grupo de los Cry2 tiene actividad contra lepidópteros y dípteros (Apaydin, 2004; Bravo et al., 1998). Además de éstas, Bt produce las llamadas proteínas Cyt (del inglés “cytolytic”) que tienen actividad contra los dípteros y actúan en sinergia con las Cry, poseen actividad hemolítica y citolíticas. También las proteínas Vip (del inglés “vegetative insecticidal proteins”), se producen en la fase vegetativa de la bacteria y tienen actividad contra lepidópteros (Vachon et al., 2012; Apaydin, 2004; Estruch et al., 1996). Las Vip no están relacionadas con las Cry en cuanto a estructura y homología de secuencia pero comparten algunas etapas en el modo de acción con las Cry, utilizando receptores distintos (Rang et al., 1999, Sauka y Benintende, 2008).

Hasta ahora existen más de 500 genes *cry* y se han clasificado 72 familias (de Cry1 a Cry72), dos grupos de proteínas Cyt y cuatro grupos de proteínas Vip, basados en su homología de secuencias de aminoácidos (Crickmore, N. et al., 2008; El-kersh et al., 2012).

1.4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.

La proteína cristalina al ser ingerida por el insecto se solubiliza en el pH alcalino del intestino formando las llamadas delta-endotoxinas (Ammounh et al., 2011; Apaydin, 2004; Carmona, 2002; Sauka y Benintende, 2008). Estas proteínas no producen el daño *per se* sino que deben ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas (monómeros) que conducirán a la muerte de la larva. La toxicidad está determinada por la presencia de receptores epiteliales en el intestino medio de la larva (Ammounh et al., 2011; Apaydin, 2004; Bravo,

2007). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina (principales moléculas de adhesión celular) con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial. Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización, dependiente del ion magnesio, que sería responsable de la muerte celular. Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula aumentando el número de receptores; por ende, reclutando un mayor número de toxinas libres que amplifican la señal inicial. Sauka y Benintende (2008), basándose en experimentos *in vitro* y bioensayos, proponen que la unión de los monómeros a la caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo *N*-terminal de la toxina. Este último clivaje induce el ensamblaje de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro (estructura que incrementa la afinidad por un receptor secundario como la aminopeptidasa *N* o la fosfatasa alcalina). Por último, la unión a este segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio que provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Figura 2). El tejido intestinal resulta dañado gravemente impidiendo la asimilación y retención de compuestos vitales y por tanto la muerte de la larva (Sauka y Benintende, 2008). Las delta-endotoxinas no presentan riesgo para los vertebrados ni para los artrópodos benéficos, siendo solo altamente tóxicas para los insectos plaga en dosis relativamente bajas (Asokan, 2008; Ammouneh et al., 2011; Roh et al., 2007).

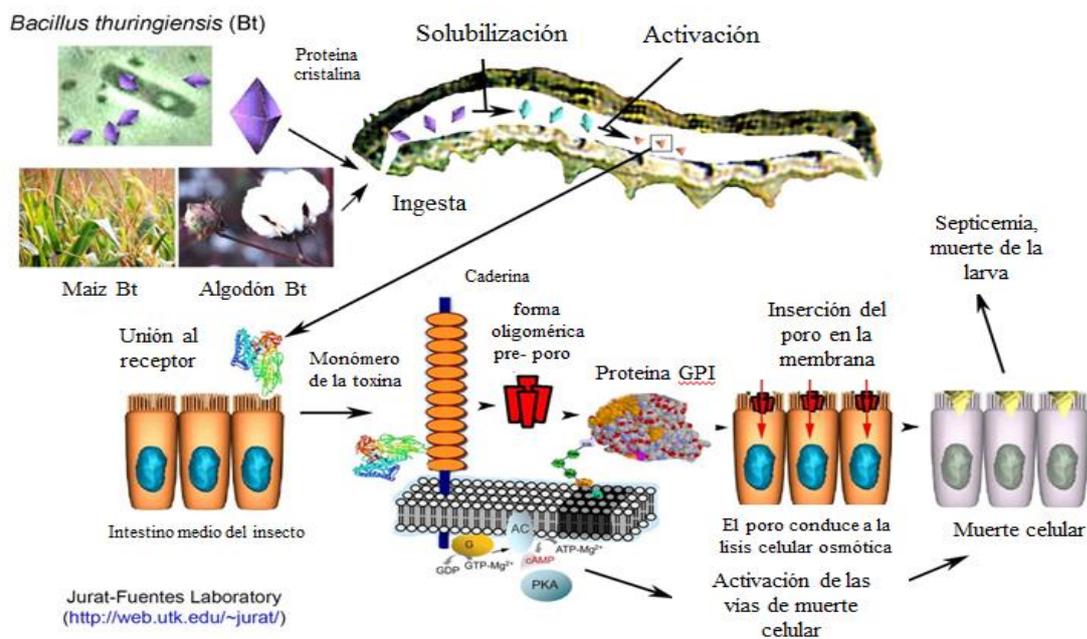


Figura 2. Mecanismo de acción de las proteínas cristalinas. La proteína ingerida se solubiliza en el intestino de la larva donde es activada por acción de proteasas y luego los monómeros se unen a receptores de caderina y se establece una forma oligomérica de pre-poro (intestino medio). Esta forma se inserta en la cara apical de las células intestinales provocándose un desequilibrio osmótico con la consecuente lisis celular y muerte de la larva. GTP: *guanosin trifosfato*. GDP: *guanosin difosfato*. PKA: *proteína quinasa A*. GPI: *glicosilfosfatidilinositol*. AC: *adenil ciclasa*. cAMP: *adenosín monofosfato cíclico*. ATP: *adenosín trifosfato*.

1.5. Estructura de las proteínas Cry.

A pesar de la gran variabilidad entre las proteínas Cry existentes, todas comparten una estructura terciaria similar, lo que se corresponde con 5 regiones conservadas en la estructura primaria (De Maagd et al., 2001; Sanahuja et al., 2011). La región C-terminal está involucrada en el proceso de formación del cristal pero no forma parte de la toxina activa. Por otro lado, la porción N-terminal es la toxina en sí, comprendiendo 3 dominios (Figura 3). El dominio I es un conjunto de siete α -hélices, en donde seis son anfipáticas y rodean a la séptima, la cual es hidrofóbica. Se ha sugerido que este dominio es el responsable de la formación de los poros en la membrana epitelial. El dominio II consiste de tres hojas β antiparalelas y es el responsable del reconocimiento del receptor. Finalmente el dominio III es un sándwich de dos hojas β antiparalelas. Este dominio participa en la unión al receptor (López-Pazos, S. A. y Cerón, J., 2010; Boonserm et al., 2006).

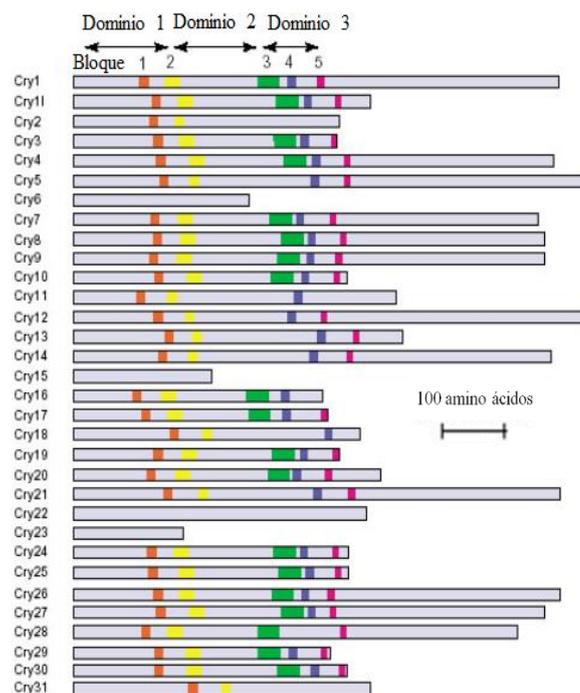


Figura 3. Estructura de los tres dominios conservados de los cristales proteicos. Longitud relativa de la estructura primaria, mostrando la organización de los dominios de distintas proteínas Cry. Se observa los cinco bloques conservados en colores.

1.6. Nomenclatura de las proteínas Cry.

En cuanto a su nomenclatura, las proteínas Cry pueden ser descriptas en términos de su secuencia aminoacídica, estructura proteica o por su modo de acción (Crickmore et al., 1998). Actualmente son clasificadas según la nomenclatura propuesta por Crickmore (1998) la cual se basa en la homología de la secuencia aminoacídica. Cada toxina adquiere un nombre que consiste del prefijo Cry, seguido por cuatro rangos jerárquicos que consisten en un número, una

letra mayúscula, una letra minúscula y finalmente otro número (por ejemplo Cry1Aa1). Las proteínas que comparten menos del 45% de la secuencia aminoacídica difieren en el rango jerárquico primario (Cry1, Cry2), con menos del 78% difieren en el rango secundario (Cry1A, Cry1B) y con menos de un 95% difieren en el rango terciario (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac). Por el contrario, el último rango indica más de un 95% de coincidencia en la secuencia aminoacídica: (Cry1Aa1, Cry1Aa2) (Roh et al., 2007).

1.7. Identificación de genes *cry*.

La técnica por excelencia en la búsqueda de nuevos genes *cry* se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su singla en inglés). Es una herramienta rápida, altamente sensible y fácil de usar para una caracterización preliminar de Bt pero tiene el inconveniente de que los cebadores son diseñados en base a secuencias conocidas por lo que tiene sus limitaciones a la hora de buscar nuevos genes (Ammounh et al., 2011; Apaydin, 2004; Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Esta técnica se ha combinado con otras técnicas para poder tener una mejor caracterización como lo es la PCR-RFLP o la E-PCR (polimorfismo de los fragmentos de restricción y PCR de exclusión, respectivamente). La primera técnica consiste de dos pasos, primero se realiza una amplificación con cebadores específicos y luego se realiza una digestión enzimática de los amplicones obtenidos (Apaydin, 2004; Kuo y Chak, 1996). La segunda técnica, E-PCR, consiste en dos reacciones secuenciales de PCR usando cebadores universales y luego cebadores específicos posibilitando el descubrimiento de nuevas variantes de estos genes (Apaydin, 2004; Porcar y Juárez-Pérez, 2003). La fiabilidad de la predicción de la actividad bioinsecticida en base a los resultados de la PCR es dependiente de la expresión de los genes. Los genes que carecen de promotores funcionales o genes que se expresan débilmente producirán una predicción errónea. Por tanto, una caracterización exhaustiva de las cepas de Bt se debe lograr por otros medios como por la determinación de la composición del cristal parasporal por SDS-PAGE (“*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*”) en simultáneo con bioensayos. Estas herramientas son un complemento fundamental para la identificación de genes (Ammounh et al., 2011; Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

2. Ortópteros en el Uruguay.

En el Uruguay los insectos que son característicos de los ecosistemas de praderas pertenecen al suborden Caelífera del orden Ortóptera. Se les denomina también saltamontes, tucuras o langostas. Se han registrado 108 especies, agrupadas en 54 géneros y 5 familias que corresponden fundamentalmente a Proscopiidae, Ommexechidae, Romaleidae y Acrididae (Martínez y Zerbino, 2008).

2.1. Biología y ecología de las tucuras.

Las tucuras, como todos los insectos, son animales de sangre fría o poiquiloterms por lo que la temperatura ambiente incide directamente en su comportamiento y ciclo biológico, regulando la eclosión de los huevos y la sucesión de estadios de desarrollo (Martínez y Zerbino, 2008). La mayoría de las especies se reproducen y oviponen en la estación de mayor temperatura, por lo que desde mediados del verano a principios del otoño se observa la mayor cantidad de especies y las densidades poblacionales más altas (Martínez y Zerbino, 2008). Sin embargo, algunas especies permanecen en la pradera durante todo el año, sobreviviendo el invierno como adultos. Cuando los días son muy calurosos se resguardan del sol directo para evitar un sobrecalentamiento, mientras que en los días muy fríos bajan su metabolismo haciendo que el forrajeo del insecto disminuya (Martínez y Zerbino, 2008). A diferencia de lo que sucede con la temperatura, los volúmenes de precipitación se relacionan en forma inversa con la densidad total de los insectos. Es notorio el aumento de las poblaciones de estos animales en condiciones de déficit hídrico, especialmente si el invierno también ha sido seco. Grandes poblaciones pueden repercutir negativamente en la productividad de los campos. Por el contrario, si se registran lluvias frecuentes el tiempo de forrajeo del insecto disminuye y aumenta su mortalidad debida al ataque de parásitos (fundamentalmente hongos y nemátodos) por lo que el impacto de estas especies en la pradera se reduce significativamente (Martínez y Zerbino, 2008).

En general las hembras prefieren poner sus huevos en suelos naturales y compactados como los caminos y las tierras no laboreadas, por lo cual los lotes bajo siembra directa permanente favorecen el incremento de la densidad de individuos, aún más en años de sequía (Martínez y Zerbino, 2008).

2.2. Daños y estrategias de control.

Poblaciones altas de tucuras pueden impactar negativamente en la actividad agrícola. Por ejemplo, en cultivos de sorgo, alfalfa, soja, maíz o girasol reducen el número de plantas en la implantación. La concentración del recurso alimentario favorece el asentamiento de plagas y el daño es causado por individuos que provienen de otros cultivos (Martínez y Zerbino, 2008). Prácticamente todas las familias químicas de insecticidas conocidos han sido evaluados en ortópteros, destacándose los organoclorados (DDT, Lindano), actualmente descartados por su impacto ambiental. También se utiliza un antagonista de GABA (ácido gama-amino butírico), el Fipronil, que inhibe el flujo celular de los iones de cloro pero se ha desestimado su uso debido a que es igualmente tóxico para las abejas. Como alternativa al uso de insecticidas químicos se han utilizado cepas de hongos entomopatógenos para el control de las poblaciones de insectos plaga. La especie más estudiada y más utilizada es *Paranosema locustae* (= *Nosema locustae*), especie que fue introducida en Argentina con buenos resultados pero en Uruguay no se han realizado estudios en este sentido (Martínez y Zerbino, 2008).

2.3. Situación en Uruguay.

En el Uruguay se registraron sequías importantes en los años 1999-2000, 2004 y 2008 que provocaron un aumento importante en las densidades poblacionales de tucuras. Estas sequías afectaron a todo el país pero tuvieron un mayor impacto en los departamentos del centro, al sur de Río Negro, fundamentalmente Florida y Durazno. Las altas densidades poblacionales observadas pueden deberse a los bajos niveles de precipitaciones y a las altas temperaturas registradas en esas primaveras. Estas condiciones favorecen un mayor número de nacimientos y eclosiones más tempranas de las tucuras.

En estudios realizados por INIA (Estación Experimental de Tacuarembó), se colectaron muestras con red en Durazno y Tacuarembó, observándose que de las 12 especies identificadas, *Borellia bruneri* (Carbonell, 1957) es la predominante. Esta especie ha sido también en el pasado la dominante de otros brotes epidémicos. En general, se alimenta de gramíneas, preferentemente de hoja fina y en bajas densidades se la encuentra en pastos altos y secos (Martínez y Zerbino, 2008).

2.4. Marco de trabajo.

En el presente trabajo se realizó una prospección general de *Bacillus* spp., procurando la obtención de aislamientos nativos de Bt mediante su caracterización morfológica, bioquímica y molecular. Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioproducción a través de técnicas microbiológicas clásicas de obtención de microorganismos mientras que las extracciones de ADN y caracterización molecular fueron realizadas en la Unidad de Biotecnología, ambos laboratorios ubicados en INIA, Las Brujas. Las tucuras procesadas forman parte del proyecto “Seguimiento de poblaciones de insectos plaga que causan daño en campo natural y arroz y prospección de sus controladores naturales como estrategia para enfrentar al cambio climático”. Las muestras de suelo y rizósfera por su parte provienen de un ensayo experimental instalado en INIA Las Brujas en 2011 con el objetivo de generar conocimiento sobre el posible impacto en el medio ambiente de la proteína Cry proveniente de maíz transgénico.

Objetivos de trabajo

Selección de cepas de *Bacillus* con potencial uso como entomopatógenos para el control de plagas.

3. Objetivos específicos.

- ✓ Aislamiento de bacterias del género *Bacillus* provenientes de suelo, rizósfera y tucuras.
- ✓ Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos bacterianos obtenidos.
- ✓ Caracterización molecular por amplificación de genes *cry1* y *cry7*.

Materiales y Métodos

4. Obtención de muestras y procesamiento.

4.1. Muestras de suelo, rizósfera y tucuras.

Durante el período 01/2011 - 03/2012 se tomaron 14 muestras (dos de suelo y 12 de rizósfera) de un ensayo experimental de variedades de maíz transgénico instalado en la Estación Experimental "Wilson Ferreira Aldunate" de INIA Las Brujas (Figura 4).



Figura 4. Ensayo experimental con maíz transgénico.

Las muestras de suelo y de rizósfera se recogieron siguiendo la metodología descrita por Baumgarte y Tebbe (2005) (Tabla 1).

Las muestras de tucuras fueron colectadas el 23 de Febrero del 2012 y enviadas por el Laboratorio de Entomología de la Estación Experimental INIA La Estanzuela. Pertenecen a las especies *B.bruneri*, *S.cliens*, *D.pratensis*, *O.punctata*. Se procesaron un total de 12 tucuras, 10 provienen del departamento de Florida y dos de Durazno (Tabla 1).

Todas las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

4.2. Procesamiento de las muestras para la obtención de Bt.

El aislamiento de bacterias en las muestras de suelo y rizósfera se llevó a cabo por el método selectivo para *Bacillus* spp. con acetato de sodio seguido por un tratamiento térmico (Travers et al., 1987; El-kersh et al., 2012). Se colocaron cinco gramos de muestra (suelo o rizósfera) en un matraz de 100 ml conteniendo 10 ml de caldo Lauria-Bertani (LB, Sigma Life Science) suplementado con una solución de acetato de sodio 0.25 M. Posteriormente la muestra se incubó por 4 horas a 30 °C en un agitador orbital (TH2-300C Shaking Incubator) a 200 rpm para inhibir la germinación de Bt. Luego de este período, un mililitro de la suspensión incubada se transfirió a un tubo de vidrio y se la sometió a un tratamiento térmico a 80° C por 10 minutos en estufa (Fisher Isotemp Incubator, modelo 303) para eliminar las células vegetativas. En presencia de esta concentración de acetato de sodio y con las cuatro horas de incubación se inhibe la

germinación de las esporas de *B. thuringiensis* pero no en otras especies de *Bacillus* (Travers et al., 1987). Por lo tanto, tratamiento térmico elimina las células vegetativas que crecen en presencia de acetato de sodio favoreciendo el aislamiento de Bt. Por último, se prepararon diluciones seriadas (-3 y -5) y se sembraron 0.1 ml con rastrillo estéril en medio LB agar.

Las muestras de tucuras fueron desinfectadas superficialmente y procesadas según el protocolo de Lacey y Brooks, 1997. Este consiste primero en sumergir a las tucuras 15 segundos en una solución de alcohol al 70%, seguido de un enjuague con agua destilada estéril; luego se trata durante un minuto con una solución de hipoclorito de sodio (1%) y Tween-20 (0.02%). Por último, se enjuagó a las tucuras tres veces consecutivas en agua destilada estéril. Luego de la desinfección superficial las tucuras se dejaron secar sobre papel de filtro estéril en corriente de aire dentro de una cámara de flujo laminar (Labculture, ESCO ClassII Type A2). Posteriormente, en condiciones de asepsia, cada tucura fue macerada con una varilla de vidrio en un tubo de 10 ml conteniendo seis mililitros de suero fisiológico (0,85 % NaCl) y se agitó por cinco minutos en vortex (Vortex-Genie 2) a velocidad máxima. A partir del macerado, se tomaron dos mililitros que se transfirieron a un segundo tubo de vidrio conteniendo cinco mililitros de agua peptonada. Esta suspensión fue sometida a un tratamiento térmico en estufa (Fisher Isotemp Incubator, modelo 303) a 80°C por 10 minutos para posteriormente ser incubada por 24 horas a 30°C. Después del período de incubación se prepararon diluciones (-3 y -5) y 100 µl de cada dilución se inocularon en placas de agar nutriente (AN, Sigma Life Science) utilizando un rastrillo de vidrio. Todas las placas inoculadas fueron incubadas a 30°C por 24 horas.

Tabla 1. Muestras utilizadas (suelo, rizósfera y tucuras).

Tipo de muestra	Muestra	Medio de cultivo	Fecha de muestreo
Suelo	1, 4	Con acetato de sodio (0.25M)	01/2011 -03/2012
Rizosfera	6, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 21, K1, L1, 1, 2		
Tucura	195, 228, 241, 248, 249, 280, 281, 282, 283, 289, 294, 299	Sin acetato de sodio	23/02/2012

Posteriormente al período de incubación, las colonias obtenidas de los distintos tipos de muestras fueron purificadas por el método de siembra en estrías y repiques sucesivos.

Finalmente, una vez obtenidas las colonias bacterianas puras, se guardaron en una solución de glicerol al 50% a -20°C, hasta su posterior procesamiento.

Se utilizaron las siguientes cepas de referencia: *B. thuringiensis* serovar *tochigiensis* (HD-868) y *B. thuringiensis* serovar *aizawai* (HD-133) (Tabla 2). Estas cepas fueron cultivadas en agar nutriente y luego se conservaron en glicerol (50%) a -20°C.

Tabla 2. Cepas de referencia. Se detallan sus respectivos genes *cry* con la especificidad de acción insecticida.

Código BGSC	Cepa	Genes	Acción insecticida
4Y1	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>tochigiensis</i> (HD-868)	<i>cry7</i>	Coleóptera
4J3	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>aizawai</i> (HD-133)	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1D</i> , <i>cry2B</i> y <i>cry9Ea</i>	Lepidóptera, Coleóptera y Díptera

4.3. Caracterización morfológica y bioquímica.

En esta etapa se evaluaron una combinación de características morfológicas; descripción de la colonia, forma y movilidad de la bacteria y pruebas bioquímicas (clasificación de Gram y actividad catalasa) que podrían indicar la presencia de *B. thuringiensis*.

4.3.1. Descripción de la colonia.

Las colonias se observaron a simple vista y bajo lupa estereoscópica binocular (Nikon, SMZ-745) en busca de colonias blancas y de borde irregular en medio AN y de color marfil en medio LB, características de Bt (Travers et al., 1987; Apaydin et al., 2004 y El-kersh et al., 2012).

4.3.2. Movilidad y morfología celular.

La movilidad bacteriana se determinó dispersando sobre un porta objeto el cultivo bacteriano en una gota de suero fisiológico (0.85 % NaCl). Se colocó un cubre objeto sobre el preparado y se observó al microscopio óptico (Olympus BH-2) a 400x. La movilidad de las bacterias se debe a la presencia de flagelos y se distinguen formas coco y bastón.

4.3.3. Clasificación de Gram.

La clasificación de los aislamientos bacterianos en Gram positivos o Gram negativos se realizó por medio del test de solubilidad en hidróxido de potasio (KOH al 3 %). Este es un método alternativo a la tinción de Gram (Hoosain y Lastovica, 2009) que consiste en mezclar sobre un porta objeto una toma del cultivo en estudio con una gota de solución de KOH al 3% . En las bacterias Gram negativas, el KOH disuelve el lipopolisacárido (pared celular) y rompe la membrana plasmática liberando el ADN con lo cual se observa una sustancia viscosa (filancia) adherida al ansa (Figura 5). En cambio, si las bacterias son Gram positivas la presencia de la pared celular impide la lisis celular y por tanto la solución de KOH permanece fluida.

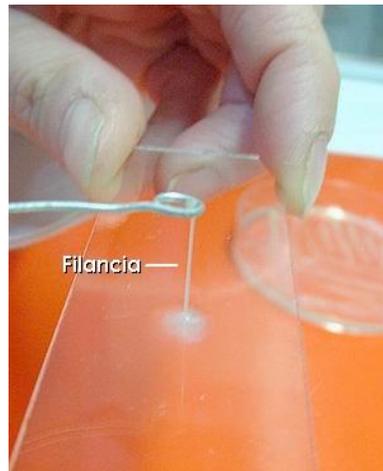


Figura 5. Test de solubilidad en KOH (Da Silvas Romeiro, 2001). En bacterias Gran negativas se observa la formación de la filancia.

4.3.4. Prueba de la actividad catalasa.

Esta prueba permite determinar la presencia de la enzima catalasa en la bacteria. Consiste en colocar una toma del cultivo sobre un porta objeto y adicionarle una gota de peróxido de hidrógeno. Es una enzima que la expresan la mayoría de las bacterias aerobias. La formación de burbujas revela la presencia de la enzima (Figura 6); en caso contrario el resultado es negativo y por tanto no hay actividad catalasa. La formación de burbujas se debe a la degradación del peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂ por la catalasa:

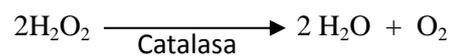


Figura 6. Actividad catalasa. La formación de burbujas se debe al O₂ liberado debido a la degradación del peróxido de hidrógeno por acción enzimática.

4.4. Caracterización molecular

Se utilizó para este propósito una combinación de procedimientos y técnicas para poder obtener una solución de ADN de buena calidad para saber si presentan o no genes *cry1* y *cry7*.

4.4.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo con el kit "DNeasy Blood & Tissue" (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los aislamientos fueron incubados a 30°C por 24 horas en 10 ml de caldo nutriente (Sigma Life Science). Posteriormente se tomó un mililitro (concentración de 2×10^9 células/ml correspondiente a una densidad óptica de 0,3 a 0,5 unidades de absorbancia) y se realizó una incubación en lisozima (AppliChem). Este procedimiento es recomendado en bacterias Gram positivas para digerir la pared celular antes de la extracción de ADN, aumentando de este modo el rendimiento de la misma.

4.4.2. Determinación de la concentración y calidad del ADN.

Para determinar la concentración y calidad del ADN obtenido se utilizó un espectrofotómetro (Nanodrop 8000 Thermo Scientific). La concentración obtenida se encontró entre los 60 y 100 ng/ml. La calidad del ADN se midió analizando el cociente entre la densidad óptica a 260 nm (longitud de onda de absorción de los ácidos nucleicos) y a 280 nm (longitud de onda de absorción de las proteínas). Se acepta como óptimo el valor de dicho cociente cuando se encuentra comprendido entre 1.7 y 2.0 unidades de absorbancia. El ADN comprendido entre dichos valores es de alta pureza para posteriores análisis.

4.4.3. Amplificación de variantes del gen *cryI* y *cry7* por PRC.

Se utilizaron dos pares de cebadores universales, uno para el gen *cryI* (Bravo et al., 1998) y otro para el gen *cry7* (Ben-Dov et al., 2001) (Tabla3). Estos genes tienen actividad contra lepidópteros y coleópteros respectivamente. El gen *cry7*, específicamente el gen *cry7Ca1* tiene actividad contra tucuras, precisamente contra *Lacusta migratoria manilensis* (Song et al., 2008; Wu, et al., 2011). La reacción de PCR se ajustó siguiendo la metodología descrita por Bravo et al., (1998)

Tabla 3. Características de los cebadores universales del gen *cryI*

Gen	Producto esperado (pb)	Secuencia del cebador
<i>cryI</i>	500-600	5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3' (d) 5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3' (r)
<i>cry7</i>	1320	5'-CATCTAGCTTTATTAAGAGATTC -3' (d) 5'-GATAAATTCGATTGAATCTAC-3' (r)

d= directo; r= reverso.

Las reacciones de PCR para *cryI* y *cry7* se realizaron en un volumen final de 50 µl conteniendo: 5.0 µl de *buffer* de PCR (1x), 1.25 µl de dNTPs (0.25 mM), 0.4 µl de cada cebador (0.3 µM), 3.0 µl de MgCl₂ (1.5 mM), 0.5 µl de Taq polimerasa (5 U/µl), 5 µl de ADN (50-100 ng/µl) y 34.45 de agua.

Para la PCR (termociclador Corbett Research) se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización del ADN a 95°C por dos minutos, seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C, hibridación a 54°C (en la cual se unen los cebadores al ADN) y extensión de las hebras a 72°C, con un minuto de duración cada una de estas etapas. Por último se incluyó un paso extra de extensión a 72 °C de cinco minutos.

4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa.

Para observar los productos amplificados en la PCR se realizó una electroforesis (Gel XL Ultra V-2, Labnet) en gel de agarosa al 2%, en una solución tampón de Tris-borato-EDTA 0.5 M (54 g tris base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0.5M pH= 8), teñido con 1 µl del colorante “Good View” (“Nucleic acid stain hgv-II”). Se sembraron 20 µl de los productos de PCR en mezcla con 3 µl de buffer de carga y 3 µl de marcador de peso molecular “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (Fermentas, Life Sciences) utilizado para identificar los fragmentos esperados del gen *cry1* comprendidos entre 500 y los 600 pb mientras que para *cry7* el fragmento esperado es de 1320 pb. El voltaje utilizado en la electroforesis fue de 135 V durante cinco minutos seguido de 40 minutos a 100 V. Los fragmentos amplificados se visualizaron por exposición a la luz ultravioleta en un transiluminador UV (Gel Logic 212 Pro, Carestream).

Resultados

5. Aislamientos bacterianos obtenidos.

A partir de las 26 muestras procesadas, se obtuvieron un total de 100 aislamientos bacterianos. De estos, 18 provienen de las muestras de tucuras, 75 de rizósfera y siete de suelo (Tabla 5, Anexo 1 Tabla 6).

5.1. Clasificación de Gram.

En total se obtuvieron 72 aislamientos Gram positivos y 26 Gram negativos. Considerando las muestras de suelo y rizósfera, 67 resultaron Gram positivos y 14 Gram negativos mientras que en tucuras solo cinco fueron Gram positivos y 12 Gram negativos (Tabla 5, Anexo 1 Tabla 6).

5.2. Caracterización morfológica y bioquímica.

Entre los 67 aislamientos Gram positivos de suelo y rizósfera, 66 mostraron forma de bastón y sólo uno forma de coco. Sin embargo, sólo 14 coinciden con las características de Bt (catalasa positivo, movilidad, forma de bastón, Gram positivo y morfología espumosa) de los cuales dos provienen de suelo: N° 601 y 607 y 12 de rizósfera: N° 519, 535, 546, 551, 570, 575, 576, 580, 591, 591, 599 y 603 (Tabla 5, Anexo 1 Tabla 6). Por otra parte, de los cinco aislamientos Gram positivos de tucuras, cuatro presentaron forma bastón y sólo uno forma coco. De los cuatro con forma de bastón, solo uno presentó las características de Bt (N° 510). En la figura 7 se observan colonias espumosas de un aislamiento que coincide con las colonias de las cepas Bt de referencia.

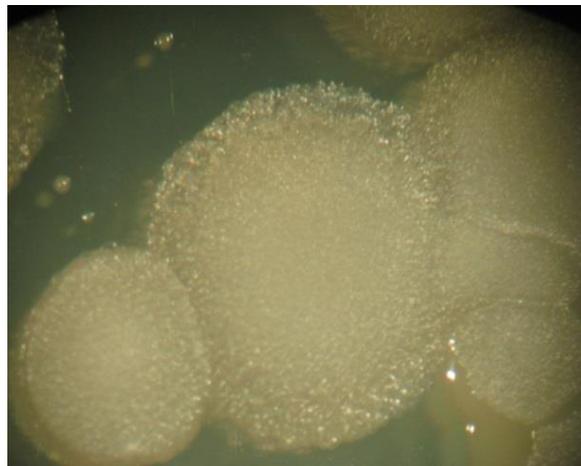


Figura 7. Morfología de la colonia bacteriana. Aislamiento obtenido a partir de una muestra de rizósfera (N° 551) con morfología espumosa similar a las cepas de referencia.

5.3. Movilidad y actividad de la catalasa.

De los 100 aislamientos obtenidos, ocho se mostraron negativos para la catalasa y 56 aislamientos no mostraron movilidad.

Tabla 5. Resultados de la caracterización morfológica y bioquímica. Se muestra el total de aislamientos obtenidos para cada característica evaluada.

	Aislamientos	Suelo	Rizósfera	Tucura
	100	7	75	18
Gram +	72	7	60	5
Gram-	26	0	14	12
Bastón	98	7	74	17
Coco	2	0	1	1
Catalasa +	92	7	67	18
Catalasa -	8	0	8	0
Movilidad +	44	1	28	15
Movilidad -	56	3	47	6

En base a los resultados previos obtenidos en la solubilidad de KOH, caracterización morfológica y pruebas bioquímicas, se seleccionaron 16 aislamientos para la detección de genes de los grupos *cryI* y *cry7*. Estos aislamientos fueron los N° 428, 508, 510, 519, 535, 546, 551, 566, 567, 571, 582, 585, 590, 592, 594 y 598.

5.4. Amplificación de genes *cryI* y *cry7*.

Se determinó por medio de este estudio molecular que de los 16 aislamientos seleccionados sólo cinco presentaron amplificación del fragmento esperado de entre 500 y 600 pb (Figura 8) correspondiente a genes *cryI*. Sin embargo, solo los aislamientos N° 551 y 566 presentaron una única banda. Los restantes tres aislamientos (N° 510, 535 y 592) presentaron más de una banda. El aislamiento N° 510 presentó dos bandas más de aproximadamente 250 y 180 pb, mientras que el N° 535 presentó una banda de aproximadamente 700 pb. En el aislamiento N° 592 se observa además de la banda correspondiente al gen *cryI*, otra banda de aproximadamente 250 pb, mientras que en el N° 582 se observan tres bandas cercanas a los 700, 600 y 300 pb.

Para el grupo de genes *cry7* se modificaron las condiciones de PCR sin lograr obtener productos de amplificación (Figura no mostrada)

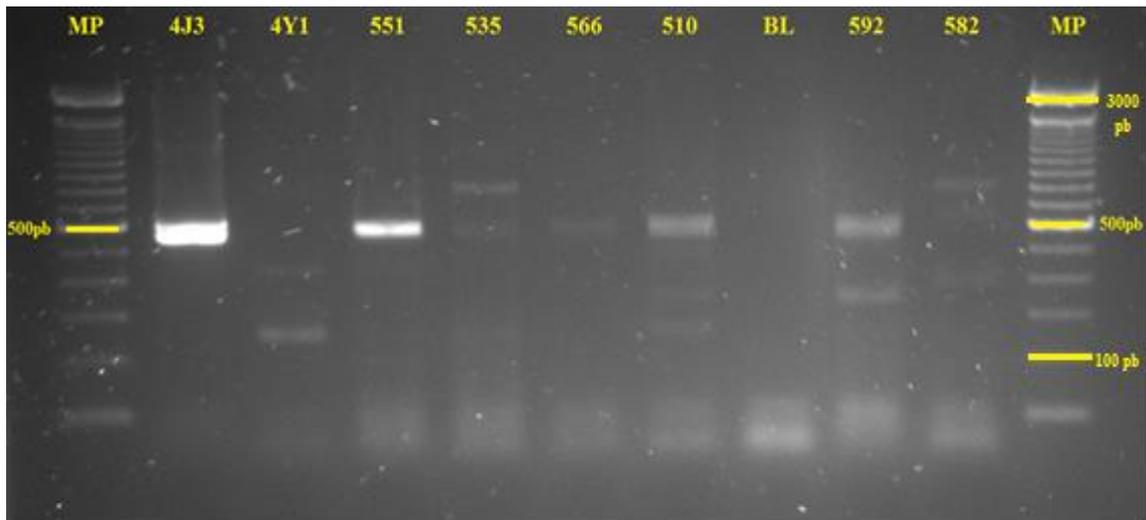


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR con cebadores que amplifican genes *cryI*. 4Y1: *B. thuringiensis* serovar *tochigiensis* (HD-868), 4J3: *B. thuringiensis* serovar *aizawai* (HD-133); aislamientos Gram positivos: N° 551, 535, 510, 592 y 582; aislamiento Gram negativo: N°566; BL: blanco de reacción; MP: marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder).

Discusión

En el marco del presente trabajo se lograron aplicar las herramientas adecuadas para realizar una caracterización morfológica, bioquímica y molecular que permitieron una primera aproximación en la selección de cepas candidatas a Bt.

Se observó una gran diferencia en el número de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de las distintas muestras procesadas (siete aislamientos de suelo, 75 de rizósfera y 18 de tucuras). Mediante la caracterización morfológica, bioquímica y molecular se pudieron identificar 15 aislamientos con las características de Bt, de las cuales una proviene de tucuras, dos de suelo y 12 de rizósfera. La mayor cantidad de aislamientos con las características de Bt obtenidos a partir de suelo y rizósfera en relación a los obtenidos a partir de tucuras podría deberse a que el método utilizado para las primeras posee un componente importante descubierto por Travers et al., (1987) que consiste en realizar una primera fase de enriquecimiento en presencia de acetato de sodio 0.25M. A esta concentración de acetato de sodio con cuatro horas incubación, los autores demostraron que las esporas de *B. thuringiensis* no germinan, permitiendo su selección luego del tratamiento térmico, en condiciones sin acetato de sodio. Aplicando esta metodología es posible obtener las bacterias deseadas desde una a 100 esporas por gramo de suelo, eliminando a las especies no deseadas ya sean formadoras o no de esporas (Travers et al., 1987). Otra causa podría estar relacionada con la diversidad microbiana asociada al tipo de muestra. El suelo es uno de los ambientes que presenta mayor diversidad microbiana, en un gramo de suelo puede haber entre 10^7 y 10^9 células, mientras que algunas estimaciones indican la posibilidad de que haya al menos 10^4 especies microbianas distintas por gramo de suelo (García, I. E., 2011; Torsvik et al., 2002). Por otro lado, en los insectos se ha encontrado también un gran número de bacterias, la mayoría saprófitas y comensales, algunas son simbióticas y ocasionalmente presentan bacterias patógenas que son capaces de ocasionar enfermedades especialmente en larvas (Cabezas, 2009). Por lo tanto, el mayor número de aislamientos obtenidos a partir de suelo y rizósfera en relación a las muestras de tucuras podría estar relacionado a la gran diversidad microbiana existente en suelo y rizósfera.

Este método descrito por Travers et al., (1987) permite obtener un mayor número de aislamientos Gram positivos (posibles *Bacillus* spp.) dentro de las cuales se encuentra Bt. Sin embargo, analizando las bacterias obtenidas en este trabajo podemos decir que el método utilizado por Travers et al., (1987) no es selectivo para el aislamiento de Bt debido a que se obtuvieron solo 14 aislamientos con las características de Bt y 14 aislamientos Gram negativos. Los autores Santana et al., (2008) y El-kersh et al., (2012) reportaron que el método utilizado por Travers et al., (1987) no es selectivo para el aislamiento de Bt a partir de muestras de suelo debido al bajo número de bacterias Bt obtenidas por ellos.

Para la amplificación de genes *cry1* y *cry7* se seleccionaron ocho aislamientos que presentaban todas las características de Bt evaluadas (N° 428, 456, 508, 510, 519, 535, 582 y 594) y siete presentaban dichas características a excepción de la movilidad (N° 551, 567, 571, 585, 590, 592 y 598). Estas bacterias no móviles también se seleccionaron debido a que es común que exista pérdida de la movilidad por los sucesivos repiques en el laboratorio (comunicación personal con el Daniel R. Zeigler, director del BGSC). Esto se confirmó en las pruebas de movilidad realizadas para varias de las cepas de referencia envidadas por el BGSC (datos no presentados). También se incluyó un aislamiento Gram negativo (N° 566) en esta selección.

El aislamiento N° 551, principal candidato a pertenecer a Bt, presentó todas las características evaluadas y una banda semejante a la de la cepa de referencia 4J3. Este aislamiento también podría contener distintas variantes del gen *cry1*. Los aislamientos N° 510 y 535, comparten las características de Bt por lo que también podrían ser Bt. Por otro lado N° 592 presenta las características de Bt, menos la morfología (rugosa ornamentada en vez de espumosas) y falta de movilidad. El aislamiento N° 582 si bien no presentó amplificación del tamaño esperado, reúne las características de Bt menos la morfología (rugosa ornamentada).

En cuanto a los aislamientos N° 519, 546 y 594, si bien presentaron las características de Bt no presentaron amplificación de genes *cry1*. Estos podrían presentar otro grupo de genes *cry* por lo que se tendrán en cuenta en futuros estudios de caracterización molecular. Estudios filogenéticos por secuenciación del gen ribosomal 16S de los aislamientos N°510, 551, 519, 582 y 592 determinaron que el aislamiento N° 551 pertenece a la especie de *B. thuringiensis* perteneciente a *B. cereus* sensu lato. Por otro lado, las secuencias de los aislamientos N° 510, 519 y 592 se agruparon con la especie *B. aryabhatai* mientras que el aislamiento N° 582 se agrupó con la especie *B. amyloliquefaciens* (Abreo et al., 2014).

En la bibliografía consultada hay antecedentes sobre la transferencia de genes *cry* por conjugación entre especies de *B. thuringiensis* y especies del grupo *Bacillus cereus* sensu lato (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* y *B. weihenstephanensis*). Todas están altamente relacionadas y algunos autores hasta consideran que *B. thuringiensis* y *B. cereus* son la misma especie. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes sobre transferencia de genes a otras especies del género *Bacillus* (Apaydin et al., 2004; Hu et al., 2004; Ibrahim et al., 2010; Radnedge et al., 2003; Thomas et al., 2000). Estos resultados podrían indicar que los genes *cry* no son exclusivos de la especie *B. thuringiensis*. La presencia de genes *cry* en *B. aryabhatai* o *B. amyloliquefaciens* deja abierta la posibilidad de que exista transferencia de genes a otras especies de *Bacillus* diferentes de *cereus*, lo cual abriría nuevos horizontes en la prospección de bacterias con actividad insecticida. Se realizará la secuenciación de los productos de PCR del tamaño esperado obtenidos de los cinco aislamientos para confirmar la presencia de genes *cry*.

En la cepa de referencia 4Y1 (que posee el gen *cry 7*) se observaron dos bandas no esperadas (figura 8). Esta amplificación inespecífica estaría explicada por las condiciones en las cuales se diseñó la PCR. En el caso del aislamiento N° 566, la banda de tamaño esperado podría deberse a una amplificación inespecífica pero con regiones genómicas. Además, ésta bacteria es Gram negativa y no se han registrado genes *cry* en este grupo.

Los aislamientos obtenidos en este estudio se conservaron en glicerol (50%) a -20°C y forman parte de la colección del Laboratorio de Bioproducción en INIA Las Brujas.

Conclusiones

1. Se determinó la presencia de bandas que se corresponden con genes *cryI* en el aislamiento N° 551 siendo confirmado como *Bacillus thuringiensis/B. cereus* por estudios de secuenciación del fragmento ribosomal 16S.
2. La presencia de bandas con el tamaño esperado de genes *cryI* en otros aislamientos identificados luego como *B. aryabhatai* (N° 510 y 592) sugieren la posibilidad de transferencia horizontal de genes *cry* entre especies del género *Bacillus*.
3. Se demostró que el método utilizado por Travers et al., (1987) no es completamente selectivo para el aislamiento de *Bacillus thuringiensis*.

Perspectivas

Los aislamientos que presentaron características similares a las cepas de referencia, así como morfología similar a la de aquellos identificados como *B. aryabathai* y *B. amyloliquefaciens* serán objeto de una caracterización molecular más precisa. En esta caracterización se emplearán cebadores universales y específicos pertenecientes tanto a otros grupos de genes *cry* como también de genes *vip* debido a que pueden existir distintas combinaciones de estos genes (Apaydin, 2004; Roh et al., 2007; Wu, et al., 2011). A su vez, para probar su potencial acción insecticida sobre insectos ortópteros que son plaga en nuestro país, se focalizará en la prospección de genes *cry7*. Por último, se complementará la secuenciación del fragmento 16S del ADN ribosomal con otros genes como el que codifica para la Gyrasa B, para confirmar la identificación. Se realizarán estudios de toxicidad y bioensayos para evaluar si presentan acción insecticida para su posible aplicación en el control de plagas agrícolas.

Bibliografía

Abreo, E., Rivas, F., Zerbino, S., Altier, N. (2014, Octubre). *Caracterización de hongos y bacterias entomopatógenas aisladas de tucuras (Orthoptera) en Uruguay*. IV Taller de Agentes Microbianos de Control Biológico, Montevideo, Uruguay, pp13.

Ammounh, H., Harba, M., Idris, E., y Makee, H. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 35(7), p. 421-431.

Apaydin, Ö. (2004) **Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats**. Tesis de maestría, Instituto de tecnología Izmir, Turquía.

Asokan, R. (2008). *Bacillus thuringiensis berliner*: Isolation to application: A review. **Agricultural Reviews**, 29(4), p.235-247.

Baumgarte, S. y Tebbe, C. (2005). Field studies on the environmental fate of the *cry1Ab* Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology**, 14(8), p.2539-2551.

Ben-Dov, E., Manasherob, R., Zaritsky, A., Barak, Z. y Margalith, Y. (2001). PCR analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by the five conserved blocks of toxins. **Current Microbiology**, 42(2), p. 96-99.

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R. y Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(12), p.4883-4890.

Berón, C. (2005). New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied And Environmental Microbiology**, 71(2), p.761-765.

Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. y Lescar, J. (2006). Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal *cry4Aa* Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8 Angstrom Resolution. **Journal of Bacteriology**, 188(9), p.3391-3401.

Boulter, D., Gatehouse, A. M. R. y Hilder, V. (1989). Use of crowpea trypsin inhibitor (CPTI) to protect plants against insect predation, **Biotechnology Advances**, 7(4), p.489-497.

Bravo, A. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* *cry* and *cyt* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, 49(4), p.423-435.

Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A. y Quintero, R. (1998). Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(12), p.4965-4972.

Cabezas, M. (2009). **Producción de *Bacillus thuringiensis*, berliner a nivel de laboratorio**. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias.

Carmona, A. (2002). Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: noctuidae). **Bioagro**, 14(1), p.3-10.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. y Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62(3), p. 807-13.

Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2008 ;http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ [Acceso 15 de Febrero 2015].

De Maagd, R. A., Bravo, A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, 17(4), p.193-9.

El-kersh, T. A., Al-sheikh, Y. A., Al-akeel, R. A. y Alsayed, A. A. (2012). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. **African Journal of Biotechnology**, 11(8), p.1924-1938.

Escudero, R., Ibáñez, I., Padilla, M. A., Carnero, A., Caballero, P. (2004). Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* strains in soils of the Canary Islands. **Boletín de Sanidad Vegetal**, 30(4), p.703-712.

Estrada, N., C., I. (2008) **Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico**. Ciencia y Tecnología; Medellín, Colombia, Universidad de Antioquia.

Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. y Koziel, M. G. (1996). *Vip3A*, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 93(11), p. 5389-5394.

Feitelson, J. S. (1993) The *Bacillus thuringiensis* family tree. En: Kim, L. **Advanced Engineered Pesticides**. Nueva York, Marcel Dekker, p. 63-72.

Frutos, R., Rang, C., Royer, M. (1999). Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, 19(3), p. 227-276.

Galeano, P. (2013). Seminario cultivos transgénicos en el cono sur. **Cultivos transgénicos en el Uruguay y otras yerbas** [Internet]. Disponible desde: <http://www.redes.org.uy/wp-content/uploads/2013/08/Pablo-Galeano-Trans-Cono-Sur-junio-2013.pdf> [Acceso 15 de Julio 2013].

Carbonell, C. S. (1957). Vuelos en masa de acridoideos (Orthoptera) en el Uruguay. **Revista de la Sociedad Uruguaya de Entomología**, 2, p.73-77.

García, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. **Revista Argentina de Microbiología**, 43, p.1-3.

Glazer, A. N. y Nikaido, H. (1995) **Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology**. 2a ed. New York.

Hernández, J; Marino, L. (1997). Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. **Corpioca**, 2(1), p.1-9.

Höfte, H. y Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, 53(2), p. 242-255.

- Hoosain, N. y Lastovica, J. (2009). An evaluation of the oxid biochemical identification system campy rapid screening test for *Campylobacteraceae* and *Helicobacter spp.* **Letters in Applied Microbiology**, 48(6), p.675-679.
- Hu, X., Hansen, B. M., Eilenberg, J., Hendriksen, B. N., Smidt, L., Yuan, Z. y Jensen, G.B. (2004). Conjugative transfer, stability and expression of plasmid encoding a *cryIAc* gene in *Bacillus cereus* group strains. **FEMS Microbiology Letters**, 231(11), p. 45-52.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., y Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered bugs**, 1 (1), p.31-50.
- Janse, J. D. y Obradovic, A. (2010). *Xylella Fastidiosa*: it's biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, 92(1), p.135-148.
- Krieg, A., Huger, A. M., Langenbruch, G. A. y Schnetter, W. (1983). *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis*: Ein neuer, gegenüber larven von Coleoptaran Wirksamer Pathotyp. **Journal of Applied Entomology**, 96(1), p.500-508.
- Kuo, S. W. y Chak, F. K. (1996). Identification of Novel *cry*-Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(4), p. 1369-1377.
- Liu, Q., Roh, J. Y., Wang, Y., Choi, J. Y., Tao, X. Y., Jin, B. R. y Je, Y. H. (2013). Characterization of a novel mosquitocidal strain of *Bacillus thuringiensis serovar aizawai* which harbors a rolling-circle replication plasmid, pBt1-3. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 16(3), p. 257-261.
- López-Pazos, S. A. y Cerón, J. (2010). Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. **Nova**, 8(14), p. 183-194.
- Martin, P. y Travers, R. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis isolates*. **Applied and Environmental Microbiology**, 55(10), p. 2437-2442.
- Martínez, G. C. y Zerbino, S. (2008) **Saltamontes y langostas en las praderas uruguayas** [Internet], Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible desde: http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_combate_de_plagas_y_malezas/102-langostas.pdf [Acceso 12 de Agosto 2013].
- MGAP, http://www.mgap.gub.uy/DGSSAA/Menu/ServEnLinea_dgsa.htm, [Acceso 19 de Julio 2014].
- MGAP, <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,gnbio,gnbio-ogms-autorizados-en-uruguay,O.es,0>, [Acceso 18 de Febrero 2015].
- MGAP/DIEA-DIGEGRA. Anuario estadístico agropecuario 2013. <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU> [Acceso 23 de octubre 2013].
- Oerke, E. C., Dehne, H. W. (2004). Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection, **Crop Protection**, 23(4), p.275-285.

Pardo, L. L., Muñoz, G. C., Porta, H., Rodríguez, C. y Soberón, M. (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of *Cry* toxins from *Bacillus thuringiensis*. **National Institutes of Health**, 30(3), p.589-595.

Porcar, M. y Juárez-Pérez, V. (2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, 26(6), p. 419-432.

Radnedge, L., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P. J., Tickmor, L.O., Kaim, P., Anderson, G-L. (2003). Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(5), p. 2755-2764.

Rang, C., Vachon, V., De Maagd, R. A., Villalon, M., Schwartz, J. L., Bosch, D., Frutos, R. y Laprade, R. (1999). Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(7), p.2918-2925.

Revista INIA Uruguay/Ing. Agr.Raúl Gómez Miller (director). Setiembre 2012/ N°30. Aguila Comunicación y Marketing, 2012.ISSN 15109011.

Roh, J., Jong, Y., Young, J. C., Li, M. S. y Jin, R. B. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17(4), p.547-559.

Romeiro, da S. (2001) **Test de solubilidad en KOH** [Internet], Facultad de agronomía. Disponible desde: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/tecnica_koh.html. [Acceso 8 de Agosto 2014].

Ruiz, I., Ibáñez, I., Carnero, A. y Caballero, P. (2004). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. **Boletín de Sanidad Vegetal.**, 30(4), p.703-712.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. y Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, 9(3), p.283-300.

Santana, M. A., Moccia, V. C., Gillis, A. E. (2008). *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), p. 357-358.

Sauka, D. H. y Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. **Revista Argentina de Microbiología**, 40(2), p.124-140.

Song, L., Gao, M., Dai, S., Wu, Y., Yi, D. y Li, R. (2008) Specific activity of a *Bacillus thuringiensis* strain against *Locusta migratoria manilensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98(2), p.169-176.

Thomas, D. J., Morgan, J. A. W., Whipps, J. M., y Saunders, J. R. (2000) Plasmid Transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory Culture and Soil and in Lepidopteran and Coleopteran Larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (1), p. 118-124.

Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, 296(5570), p.1064-1066.

Travers, R. S., Martin, P. A. W. y Reichelderfer, C. F. (1987). Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, 53(6), p.1263-1266.

USEPA, Meeting summary: EPA-USDA Bt crop insect resistance management workshop. [Internet]. Disponible desde: <http://www.epa.gov/oppbpd1/biopesticides/summary/826.htm>. [Acceso 23 de Enero 2013].

Vachon, V., Laprade, R. y Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 111(1), p. 1-12.

Van den Bosch, R. y A. D. Telford. (1964) Environmental modification and biological control. En: De Bach, P., ed.; **Biological control of insect pests and weeds**, Londres, Chapman and Hall, p. 459-488.

Van Frankenhuyzen, K. (1993) The challenge of *Bacillus thuringiensis*. En: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., Higgs, S. **Bacillus thuringiensis: an Environmental Biopesticide**. Nueva York, John Wiley y Sons, p.1-35.

Wu, Y., Lei, C., Yi, D., Liu, P. y Gao, M. (2011). Novel *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Active against *Locusta migratoria manilensis*, **Applied and Environmental Microbiology**, 77(10), p. 3227-3233.

ANEXO 1

Tabla 6. Caracterización molecular y bioquímica de los aislamientos bacterianos obtenidos de muestras de suelo, rizósfera y tucuras. Se muestran los detalles de las dos cepas de referencia y de los 100 aislamientos provenientes de las 26 muestras.

Tipo de muestra	Nº de aislamiento	Morfología	Forma	Gram	Movilidad	Catalasa	PCR
Suelo	585	Crema redonda	B	+	-	+	-
	600	Rugosa ornamentada	B	+	-	+	nr
	601	Espumosa	B	+	+	+	nr
	586	Crema	B	+	-	+	nr
	605	Rugosa espumosa	B	+	-	+	nr
	606	Crema redonda	B	+	-	+	nr
	607	Espumosa	B	+	-	+	nr
Rizósfera	516	Crema con corona	B	+	+	+	nr
	518	Hialina tornasol	B	+	-	+	nr
	519	Espumosa	B	+	+	+	# +
	520	Opaca	B	+	-	+	nr
	522	Crema hialina	B	+	+	+	nr
	532	Hialina transparente tornasol	B	+	+	+	nr
	539	Hialina tornasol	B	+	+	+	nr
	540	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	541	Hialina tornasol amarilla	B	+	-	+	nr
	543	Hialina tornasol	B	+	+	+	nr
	545	Rugosa tipo 1	B	+	-	+	nr
	547	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	548	Tornasol	B	+	-	+	nr
	549	Rugosa ornamentada	B	+	+	+	nr
	550	Hialina	B	-	+	+	nr
	551	Espumosa	B	+	-	+	# +
	552	Crema	B	+	-	+	nr
	553	Rugosa ornamentada	B	-	-	+	nr
	554	Crema redonda	B	+	-	+	nr
	555	Amarilla	B	-	-	+	nr
	577	Opaca	B	+	-	+	nr
	578	Amarilla	B	+	-	+	nr
	579	Crema redonda	C	+	-	+	nr
	580	Espumosa	B	+	-	+	nr
	581	Rugosa ornamentada	B	+	+	+	nr
	512	Crema tornasol.	B	-	+	+	nr
	513	Rugosa tipo 1	B	+	-	+	nr
514	Hialina	B	+	+	+	nr	
515	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr	

Rizósfera	517	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	521	Amarilla	B	+	-	+	nr
	523	Crema opaca	B	+	-	+	nr
	524	Transparente hialina	B	-	+	+	nr
	525	Hialina torna.	B	+	+	+	nr
	526	Crema	B	+	-	+	nr
	533	crema con corona	B	+	-	+	nr
	534	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	535	Espumosa	B	+	+	+	+
	536	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	537	Rugosa tipo 1	B	+	-	-	nr
	538	Hialina	B	+	-	-	nr
	542	Rugosa tipo 1	B	+	-	+	nr
	544	Rugosa tipo 1	B	+	-	+	nr
	546	Espumosa	B	+	+	+	-
	556	Hialina	B	-	-	+	nr
	557	Blanca	B	+	-	+	nr
	567	Rugosa ornamentada	B	+	-	+	-
	568	Amarilla	B	+	+	+	nr
	569	Crema redonda	B	+	+	+	nr
	570	Espumosa	B	+	-	+	nr
	571	Blanca redonda	B	+	-	+	-
	572	Crema redonda	B	+	-	+	nr
	573	Rugosa ornamentada	B	+	+	+	nr
	574	Amarilla	B	+	-	+	nr
	575	Espumosa	B	+	-	+	nr
	576	Espumosa	B	+	-	+	nr
	582	Rugosa ornamentada	B	+	+	+	# -
	583	Rugosa ornamentada	B	-	+	+	nr
	587	Crema redonda	B	+	-	+	nr
	595	Rugosa ornamentada	B	-	+	+	nr
	596	Lechosa hialina	B	-	-	+	nr
	597	Blanca rugosa	B	+	+	+	nr
	598	Crema redonda	B	+	-	+	-
	599	Espumosa	B	+	-	+	nr
	602	Crema redonda	B	+	-	+	nr
603	Espumosa	B	+	+	+	nr	
604	Hialina	B	-	+	+	nr	
584	Crema redonda	B	+	-	+	nr	
588	Rugosa ornamentada	B	-	+	+	nr	
589	Rugosa ornamentada	B	-	+	+	nr	

Rizósfera	590	Amarilla	B	+	-	+	-
	591	Espumosa	B	+	+	+	nr
	592	Rugosa ornamentada	B	+	-	+	# +
	593	Amarilla	B	nd	-	+	nr
	594	Espumosa	B	+	+	+	-
Tucura	428	Blanca pequeña	B	+	+	+	-
	429	Blanca redonda	B	-	-	+	nr
	430	Amarilla	C	+	-	+	nr
	431	Amarilla hialina	B	-	+	+	nr
	432	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	433	Amarilla rugosa	B	nd	-	+	nr
	434	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	435	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	436	Amarilla hialina	B	+	+	+	nr
	437	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	438	Blanca redonda tomasol	B	-	+	+	nr
	439	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	440	Blanca pequeña	B	-	+	+	nr
	441	Hialina tomasol	B	-	+	+	nr
	508	Crema hialina	B	+	+	+	-
	509	Crema redonda hialina	B	-	+	+	nr
	510	Espumosa	B	+	+	+	# +
566	Blanca redonda hialina	B	-	+	+	+	
HD-868	4Y1	Espumosa	B	+	+	+	+
HD-133	4J3	Espumosa	B	+	+	+	-

nd: no determinado; nr: no realizado; HD-868: *B. thuringiensis* serovar *tochigiensis*; HD-133: *B. thuringiensis* serovar *aizawai*; +: aislamientos que mostraron amplificación con una banda del tamaño esperado; -: aislamientos que no mostraron amplificación del gen *cryI*; # aislamientos confirmados que pertenecen al género *Bacillus*.